

Über die Beeinflussung der endogenen Atmung
gewaschener Mäuse-Ascites-Carcinomzellen
durch Glukose und Fruktose

von

BORIS KUBALEK

Aus der I. Medizin. Klinik
der städtischen Krankenanstalten Nürnberg
Vorstand: Stadtmedizinaldirektor
Prof. Dr. Dietrich J a h n

=====

Über die Beeinflussung der endogenen Atmung
gewaschener Mäuse-Ascites-Carcinomzellen
durch Glukose und Fruktose

=====

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ZU
ERLANGEN

Vorgelegt von
B o r i s K u b a l e k
aus Böhmisches-Leipa

1956



Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen

Dekan: Prof.Dr.C.Korth

1.Referent : Prof.Dr.D.Jahn

2.Referent : Prof.Dr.F.Heim

Tag der mündlichen Prüfung : 13.1.1956

I N H A L T

	Seite
Einleitung	1
Methodik	4
Ergebnisse	11
A. Messungen des Sauerstoffverbrauches der Ascites-Carcinomzellsuspensionen	11
1. Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffaufnahme	11
2. Der Sauerstoffverbrauch der Ascites- Carcinomzellsuspensionen im Leerver- such und unter Glukose und Fruktose	13
B. Messungen der CO ₂ -Bildung der Ascites- Carcinomzellsuspensionen	17
C. Der respiratorische Quotient der Ascites-Carcinomzellsuspensionen	21
Diskussion	24

E I N L E I T U N G

Das von LOEWENTHAL und JAHN (1) als Variante des EHRLICH-Mäusecarcinoms gezüchtete Mäuse-Ascitescarcinom stellt ein beliebtes Testobjekt für Untersuchungen der Biologie maligner Tumorzellen dar. Es ist ein experimentell reproduzierbarer, maligner Tumor, dessen Besonderheit darin besteht, daß seine Zellen, frei in einem Exsudat schwimmend, als Zellsuspension die Peritonealhöhle des tumorkranken Tieres erfüllen. Seine Vorteile gegenüber soliden experimentellen Tumoren beruhen auf der Konstanz des Krankheitsbildes, ferner darauf, daß durch Punktion laufend Proben des Tumors entnommen werden können, die als Ausstriche oder Zellsuspensionen vor allem auch quantitativen Untersuchungen zugänglich sind.

Die leichte Standardisierbarkeit der Ascites-Tumorproben, bedingt durch die Möglichkeit die unversehrten Zellen in entsprechenden Nährlösungen zu suspendieren und die Zellzahl der Suspensionen in der Zählkammer zu bestimmen, macht sie besonders geeignet für quantitative biochemische Arbeiten.

Frühere Untersuchungen des Mäuse-Ascitescarcinoms beschäftigen sich vorwiegend mit seiner Morphologie, seinem Wachstum und seiner Übertragbarkeit. Arbeiten über die Biochemie der Ascites-Tumorzellen

sind verhältnismäßig jungen Datums. Sie bringen vor allem genauere Angaben über den Nucleinsäuregehalt der Tumorzellen, ihre Vitalfärbbarkeit und ihre Beeinflussung durch zytostatische Substanzen. (2).

Den Stoffwechsel der Ascitescarcinomzellen konnten KUN und TALALAY (3) näher aufklären. Sie untersuchten Atmung und anaerobe Glykolyse der Zellen sowie die Aktivität einer Anzahl von Einzelfermenten in den Tumorzellen und in der Ascitesflüssigkeit.

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die Untersuchungen der endogenen Atmung der Ascitescarcinomzellen von Interesse, d.h. der Atmung gewaschener Tumorzellen ohne Zusatz energieliefernder Substrate, und die Beeinflussung dieser Atmung durch eine Reihe von Testsubstanzen.

So fanden KUN und TALALAY (3) eine Erhöhung des endogenen Sauerstoffverbrauches durch Zugabe von Succinat; Ribose, l-Prolin, dl-Lactat, l-Asparaginat, Glycerol und Pyruvat lassen ihn unbeeinflusst. Zusatz von Hexosen setzt hingegen den endogenen Sauerstoffverbrauch der Zellen herab.

Nähere Angaben darüber, ob sich die für den Kohlenhydratstoffwechsel tierischer Zellen wichtigsten Hexosen, Glukose und Fruktose, hinsichtlich des Ausmaßes der Herabsetzung des Sauerstoffverbrauches gleich verhalten, werden in den Untersuchungen von KUN und TALALAY nicht gemacht. Ebenso sind keine Untersuchungen darüber vorhanden, wie die beiden Zucker unter aeroben Bedingungen die CO_2 -Bildung der Zellen beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit stellt sich die Aufgabe

- 1) die endogene Atmung, also O_2 -Verbrauch und CO_2 -Bildung gewaschener Mäuseascitescarcinomzellen zu untersuchen
- 2) die durch Glukose einerseits, durch Fruktose an-

dererseits bewirkten Verschiebungen in O_2 -Verbrauch
und CO_2 -Bildung zu messen und miteinander zu ver -
gleichen.

M E T H O D I K

Züchtung und Übertragung des Ascitescarcinoms

Das Mäuseascitescarcinom, das den folgenden Untersuchungen zugrunde liegt, ist ein vom Lettré - schen Institut in Heidelberg überlassener Stamm.

Als Versuchstiere werden 1 - 2 Monate alte weiße Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet, die mit Hafer, Brot und Milch ernährt werden.

Sie werden mit je 0,2 ml Tumor-Ascites intraperitoneal geimpft und können nach 7 - 10 Tagen zur Weiterverimpfung punktiert werden. Nach 10 - 14 Tagen haben sie eine Ascitesmenge gebildet, die genügend Tumorzellen enthält und für die Herstellung der zu den Versuchen benötigten Zellsuspensionen ausreicht. Zu diesem Zeitpunkt werden die Versuchstiere getötet. Der Ascites wird durch Eröffnung der Bauchhöhle abgelassen.

Die Ausbeute an Ascites läßt sich durch Verfütterung großer Milchmengen erhöhen.

Herstellung der Zellsuspensionen

Die Ascites-Carcinomzellsuspensionen werden in Anlehnung an die von KUN und TALALAY (3) beschriebene Methode wie folgt hergestellt:

Das Versuchstier wird durch Brechen der Halswirbelsäule getötet. Durch Eröffnung der Bauchhöhle wird der Ascites in Meßspitzgläser entleert und 4 min lang

bei 2000 U/min zentrifugiert. Das überstehende Ascitesplasma wird verworfen. Die Zellen werden zweimal im Verhältnis 1:3 mit Sörensen-Phosphatpuffer, p_H 7,4 versetzt und gewaschen. nach jeder Waschung 3 min lang bei 2000 U/min sedimentiert und die zur Waschung verwendete Pufferlösung abgesehen.

Nach der 2. Waschung wird das Volumen der Sedimentierten Zellen gemessen und das Sediment im dreifachen Volumen Sörensen-Phosphatpuffer, wie oben, suspendiert.

Von 1 ml der Suspension wird nach KJEHLDAHL der Stickstoffgehalt bestimmt, da die gemessenen Atmungsgrößen in Übereinstimmung mit KUN und TALALAY jeweils in ~~cm~~ Gasverbrauch bzw. -bildung /mg N ausgedrückt werden um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Suspensionen in ihrer Atmung untereinander zu erhalten.

Der Zusatz der in Ringerlösung enthaltenen Salze zur Pufferlösung ergab in einigen Vorversuchen keine Änderung der Atmungsgrößen. Daher wurde auf Salzzusatz verzichtet.

Messung der Atmungsgrößen

Die Atmung der gewaschenen Ascites-Carcinomzellen wird manometrisch in der Warburg-Apparatur (BRAUN, Messungen, Modell "V") gemessen und zwar unter Anwendung der direkten Methode von WARBURG (4).

Bei der direkten Warburg-Methode wird zur Messung des Sauerstoffverbrauches von Gewebe in einem auf konstanter Temperatur gehaltenen Reaktionsgefäß das bei der Atmung freiwerdende CO_2 durch Kalilauge absorbiert. Der Ausschlag eines an das Reaktionsgefäß angeschlossenen Manometers entspricht dann unter Berücksichtigung der für die herrschenden Versuchsbedingungen und jedes Manometer mit zugehörigem Gefäß

errechneten Konstanten x) direkt dem O_2 -Verbrauch im Reaktionsgefäß.

Es gilt die Formel:

$$x_{O_2} = h \cdot k_{O_2} \dots\dots\dots 1.$$

Dabei ist

- x_{O_2} = Menge des verbrauchten O_2 in cmm NTP
- h = abgelesener Manometerausschlag in mm
- k_{O_2} = Gefäßkonstante für O_2

Die Bestimmung der CO_2 -Bildung erfolgt nach der gleichen Methode, wobei die CO_2 -Absorption im Reaktionsgefäß unterbleibt. Im Parallelversuch muß gleichzeitig der O_2 -Verbrauch des Gewebes mitbestimmt werden. Man erhält so 2 parallellaufende Meßreihen:

- 1) den reinen O_2 -Verbrauch
- 2) die Resultante aus O_2 -Verbrauch und CO_2 -Bildung.

Die CO_2 -Bildung wird dann aus dem Manometerausschlag des Gefäßes ohne Absorption mit Hilfe des

x) Diese Konstanten (Gefäßkonstanten) ergeben sich aus der Formel:

$$k = \frac{V_G \frac{T}{273} + V_F \cdot a}{P_0},$$

- wobei :
- V_G = Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß
 - V_F = Volumen der Flüssigkeit im RG
 - a = Absorptionskoeffizient des gemessenen Gases
 - T = Versuchstemperatur in $^{\circ}$ abs.
 - P_0 = Normaldruck, ausgedrückt in mm der verwendeten Manometerflüssigkeit (Brodie-Lösung)

gleichzeitigen Sauerstoffverbrauches errechnet,
nach der Formel:

$$x_{\text{CO}_2} = \left(h - \frac{x_{\text{O}_2}}{k_{\text{O}_2}} \right) \cdot k_{\text{CO}_2} \dots\dots 2.$$

Dabei :

- h = abgelesener Manometerausschlag
- x_{CO_2} = Menge des gebildeten CO_2 in cmm
- x_{O_2} = im Parallelversuch mitbestimmter Sauerstoffverbrauch
- k_{O_2} = Sauerstoffgefäßkonstante
- k_{CO_2} = CO_2 -Gefäßkonstante

Bei diesen Parallelbestimmungen ergeben sich Ungenauigkeiten dadurch , daß das Gewebe einmal in einer CO_2 - freien , einmal in einer CO_2 - haltigen Atmosphäre atmet , wodurch nach DIXON (4 ,S.65) der O_2 - Verbrauch gleicher Gewebemengen in beiden Gefäßen verschieden sein kann.

Dieser Nachteil betrifft vor allem die Messung des gebildeten CO_2 , da dieses ja indirekt über den O_2 -Verbrauch errechnet wird (s.Formel 2.).

Weiterhin wird die Messung der CO_2 -Bildung dadurch ungenau , daß ein Teil des gebildeten Gases in der Phosphatpufferlösung retiniert wird.

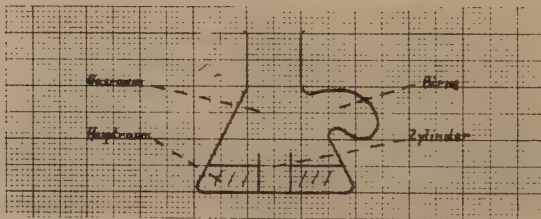
Die mit dieser Methode ermittelten Größen lassen daher nur eine vergleichende Beurteilung der CO_2 -Bildung hinsichtlich einer Vermehrung oder Verminderung gegenüber Vergleichsversuchen zu . Eine andere Methode zur Bestimmung der CO_2 -Bildung war wegen der beschränkten Manometerzahl der Apparatur nicht zugänglich.

Die während der Versuche durch geringe Änderungen der Temperatur des Wasserbades und Änderungen des äußeren Luftdruckes hervorgerufenen Manometerschwankungen werden durch ein bei jedem Versuch mitgeführtes

Thermobarometer registriert und bei der Berechnung in Abzug gebracht . Das Thermobarometer ist ein Warburgmanometer , dessen Reaktionsgefäß kein atmendes Gewebe , sondern nur destilliertes Wasser in entsprechender Menge enthält . Im Leerversuch zeigte die verwendete Pufferlösung mit und ohne Zusatz von Zucker keine manometrischen Unterschiede gegenüber destilliertem Wasser .

Füllung der Warburg - Reaktionsgefäße

Zur Verwendung gelangten die gebräuchlichen 15 ml-Warburg - Kölbchen mit einer Birne , wie sie in Abb.1 gezeigt sind .



Sie werden wie folgt beschickt :

Der Gasraum mit Luft .

Der Hauptraum mit 1,5 ml Sörensen-Phosphatpuffer , p_H 7,4 und 1,0 ml der Ascites-Carcinomzellsuspension.

Die Birne enthält 0,5 ml der gleichen Pufferlösung. Darin ist der zu untersuchende Zusatz in der 6 fachen gewünschten Konzentration gelöst , da bei Versuchsbeginn der Birneninhalt durch Einkippen in den Hauptraum im Verhältnis 1 : 6 verdünnt wird. Bei den Leerversuchen entfällt der Zusatz in der Pufferlösung.

Der Zylinder am Boden des Reaktionsgefäßes

enthält bei den Versuchen zur Bestimmung der O_2 -Aufnahme 0,4 ml 20 % ige KOH zur Absorption des freiwerdenden CO_2 und zur Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche ein Röllchen aus Filterpapier (18 x 40 mm) . Bei den Versuchen zur Messung der CO_2 - Bildung enthält der Zylinder 0,4 ml Aqua dest. zum Ausgleich des Volumens.

Das Gesamtvolumen der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß beträgt somit 3,4 ml . Es bleibt dann bei einem mittleren Gefäßvolumen von 15 ml ein Gasraum , von 11,6 ml , dessen O_2 - Partialdruck während der Versuche bei dem geringen Sauerstoffverbrauch der Zellsuspensionen nur wenig absinkt . Die Füllung des Gasraumes mit reinem Sauerstoff erübrigt sich nach KUN und TALALAY (3) , da sie die O_2 - Aufnahme der Zellen nicht erhöht .

Beschickung des Thermostaten und Versuchsverlauf

Die Reaktionsgefäße werden an das zugehörige Manometer angeschlossen und in das Wasserbad des Warburg - Thermostaten gebracht.

Nach 15 min Temperaturlausgleichszeit bei geöffneten Manometerhähnen beginnt der Versuch mit dem Schließen der Hähne und Einkippen des Zusatzes aus der Birne in den Hauptraum des Reaktionsgefäßes.

Während des Versuches werden die Reaktionsgefäße mit einer Frequenz von 120 / min und einer Amplitude von 2,5 cm geschüttelt.

Die Versuchstemperatur beträgt 37° C.

Die Manometeraus schläge werden nach einer Stunde abgelesen .

Auswertung der Versuchsergebnisse

Nach den Formeln 1. und 2. wird aus den abgelesenen Manometeraus schlägen der O_2 - Verbrauch oder die CO_2 -

Bildung pro Reaktionsgefäß und Stunde errechnet. Daraus wird über den Stickstoffgehalt der Zellsuspensionen der O_2 -Verbrauch oder die CO_2 -Bildung in $cm^3 / mg N$ und Stunde umgerechnet.

Sämtliche Atmungsgrößen in den folgenden Tabellen tragen diese Benennung.

ERGEBNISSE

=====

A.Messung des Sauerstoffverbrauches der Ascites- Carcinomzellsuspensionen

1. Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffaufnahme.

An Hand des zeitlichen Verlaufes der O_2 -Aufnahme wurde zunächst der für die Messungen der Atmung günstigste Zeitabschnitt ermittelt.

Dazu wurde in 10 Vorversuchen die Sauerstoffaufnahme der Ascites - Carcinomzellen im Leerver such und unter Glukose und Fruktose ,jeweils in Konzentrationen von 200 mg % über 2 Stunden gemessen. Die Mittelwerte der Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben .

Tabelle 1

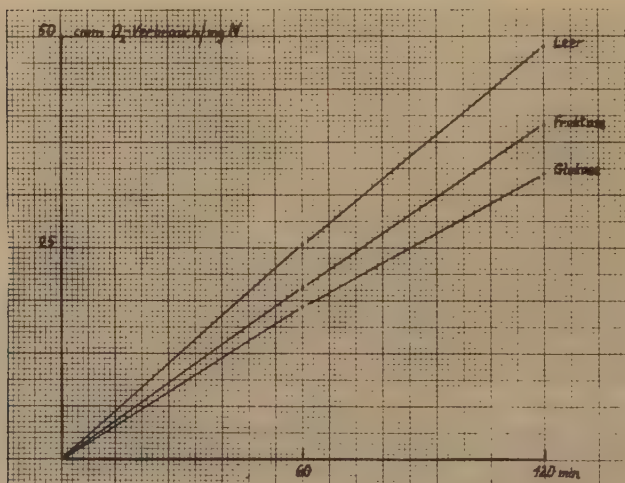
Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffaufnahme
von Ascites-Carcinomzellsuspensionen

Zeit in min	Sauerstoffverbrauch in cmm/mgN		
	im Leer- versuch	mit Fruktose 200 mg %	mit Glukose 200 mg%
60	25,2	20,2	18,1
120	48,8	39,6	33,8

Abbildung 2 bringt die graphische Darstellung der Sauerstoffaufnahme durch die Zellen in den ersten 2 Stunden .

Aus ihr geht hervor , daß die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme während dieses Zeitabschnittes annähernd konstant bleibt . Deshalb wurde eine Versuchsdauer von 60 min für die im Folgenden aufgeführten Versuche als genügend erachtet.

Abbildung 2
Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffaufnahme von Ascites-Carcinomzellsuspensionen



Die Vorversuche ergaben ferner , daß die Größe des Sauerstoffverbrauches relativ hohen Schwankungen von Zellsuspension zu Zellsuspension unterworfen ist. Dies macht für die folgenden Versuche eine Versuchsanordnung erforderlich , bei der Leeratmung und Atmung unter Zuckerzusatz jeweils nebeneinander an einer Zellsuspension untersucht werden. Nur dann ist ein Vergleich der Versuchsreihen zulässig. Diese Anordnung liegt allen folgenden Versuchen zugrunde.

2. Der Sauerstoffverbrauch der Ascites-Carcinomzellen mit und ohne Zusatz von Hexosen.

In Tabelle 2 sind die Einzelwerte der Untersuchungen über den Sauerstoffverbrauch der Carcinomzellsuspensionen wiedergegeben, bestehend aus 72 Leerversuchen und je 72 Versuchen mit Glukose oder Fruktose in verschiedenen Konzentrationen

Tabelle 2

O₂-Verbrauch der Ascitescarcinomzellsuspensionen in cm^3 / mg N und Stunde

Leerver- such	Versuch mit Glukose Fruktose	Zucker- konz.
22,7	16,5	19,7
24,5	16,3	16,7
25,5	17,4	19,8
26,1	16,8	17,4
27,6	23,5	26,0
26,6	24,5	25,7
17,2	13,9	14,7
24,4	17,5	19,7
17,2	13,9	14,7
27,7	16,5	19,7
31,0	20,5	21,6
32,6	20,1	21,8
20,5	14,8	17,7
19,6	15,8	16,7
29,8	21,3	24,6
30,6	21,3	24,2
18,2	16,8	17,6
18,2	16,6	17,2
41,7	24,4	27,8
44,5	21,1	28,5
38,0	19,0	23,3
35,9	20,8	22,4
27,0	18,5	20,2
27,6	19,5	21,4
19,5	7,6	15,8
18,2	16,8	17,0
17,7	14,5	17,2

Tabelle 2 (Forts.)

Leer- ver- such	Versuch mit Glukose Fruktose	Zucker- konz.
20,1	13,2	15,2
18,2	12,7	14,5
22,5	12,3	14,9
19,4	12,3	13,2
19,8	12,7	14,5
20,5	18,3	18,7
22,3	19,2	21,3
21,8	17,9	21,3
22,2	17,9	20,6
26,8	23,0	23,2
23,6	20,3	23,1
25,8	20,3	23,5
27,2	21,1	24,2
20,7	16,0	16,4
12,8	9,1	10,5
18,6	15,5	16,0
15,0	12,5	14,6
23,2	21,9	22,1
26,7	22,1	23,7
23,7	19,3	21,5
26,8	19,8	19,8
18,7	11,8	14,5
17,9	11,1	14,9
17,6	8,4	11,8
20,2	12,6	13,0
16,2	9,5	13,7
16,2	9,5	10,8
14,1	9,5	10,8
17,3	10,0	11,2
27,4	17,0	20,5
26,7	18,4	19,8
22,7	18,0	20,8
22,7	17,3	22,1
37,8	26,3	26,4
36,8	22,5	25,8
25,8	20,3	23,4
24,2	20,8	22,7
20,1	16,8	18,2
19,4	16,8	17,5
26,6	17,7	19,8
27,3	18,4	18,7
26,3	19,4	20,2
24,7	19,9	20,7
25,3	19,2	23,0
24,7	19,6	22,3

Die waagerecht nebeneinanderstehenden Ergebnisse wurden jeweils an einer Zellsuspension ermittelt.

Tabelle 3 bringt die statistische Auswertung der Einzelergebnisse aus Tabelle 2 .

Tabelle 3
Mittlerer O₂-Verbrauch der Ascites-
Carcinomzellsuspensionen und seine
Schwankungen

	Leerversuche		Versuche		Versuche	
	m. Glukose		m. Glukose		m. Fruktose	
	100-1000		100-1000		100-1000	
	mg %		mg %		mg %	
Mittlerer O ₂ -Verbrauch in cmm / mg N und Stunde	23,6		17,1		19,2	
Mittlere Versuchsstreuung in cmm / mg N und Stunde	± 6,8		± 4,2		± 4,3	

Wie die Tabelle 3 ausweist , beträgt der mittlere O₂-Verbrauch der Ascites-Carcinomzellsuspensionen 23,6 cmm / mg N und Stunde . Diese Größe bleibt hinter den von KUN und TALALAY (3) ermittelten Werten zurück. KUN und TALAY untersuchten jedoch nur 9 Zellsuspensionen.

Bei Zusatz von Glukose in Konzentrationen von 100 - 1000 mg % verbrauchen die Zellsuspensionen im Mittel 17,1 cmm O₂ / mg N und Stunde .

Bei Zugabe von Fruktose in den gleichen Konzentrationen beträgt der O₂-Verbrauch 19,2 cmm / mg N und Stunde.

Bei prozentueller Auswertung dieser Ergebnisse erhält man eine Minderung des Sauerstoffverbrauches durch Glukose um 27,5 % , durch Fruktose um 18,6 % , verglichen mit dem Leerwert.

Die Signifikanz des Unterschiedes im mittleren O₂-Verbrauch unter Glukose einerseits und Fruktose andererseits wurde mit Hilfe des t - Vergleiches (5)

nachgeprüft. Danach handelt es sich um eine echte Differenz . Der t - Wert beträgt 2,98 , bei 142 Freiheitsgraden , was einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99 % für die Verschiedenheit der beiden Kollektive entspricht.

Glukose schränkt also den Sauerstoffverbrauch der Ascites-Carcinomzellen stärker ein als Fruktose im gleichen Konzentrationsbereich.

Zur Wahl der Zuckerkonzentrationen ist zu bemerken , daß die Herabsetzung der O_2 -Aufnahme keinerlei Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration im gewählten Bereiche zeigt. Deswegen erscheint es auch als berechtigt die drei Versuchsreihen - Leerversuche , Versuche mit Glukose 100 - 1000 mg % und Versuche mit Fruktose 100 - 1000 mg % - statistisch als je ein Kollektiv zu bewerten , zumal mit einer Zuckerkonzentration jeweils die gleiche Anzahl von Versuchen mit Glukose- und Fruktosezusatz gemacht wurde.

B. Messung der CO₂-Bildung der Ascites-
Carcinomzellsuspensionen

In Tabelle 4 sind die Einzelwerte der Untersuchungen über die CO₂-Bildung der Ascites-Carcinomzellsuspensionen wiedergegeben, bestehend aus 40 Leerversuchen und je 40 Versuchen mit Glukose und Fruktose in verschiedenen Konzentrationen.

Tabelle 4

CO₂-Bildung der Ascites-Carcinom-
zellsuspensionen in cmm / mg N und Stunde

Leerver- such	Versuch mit Glukose	Fruktose	Zucker- konz.
6,0	18,9	17,2	100 mg %
6,9	17,2	20,0	
9,0	17,2	16,3	
10,1	16,5	21,2	
7,3	20,8	25,0	
8,3	19,8	25,0	
5,5	15,8	12,5	
6,1	14,1	14,1	
8,1	18,4	20,3	
9,1	16,0	21,7	
15,4	24,2	17,6	200 mg %
17,0	24,6	18,6	
8,1	10,0	12,9	
8,1	11,0	13,2	
9,7	21,7	23,0	
10,6	20,8	24,7	
5,6	11,6	9,6	
5,9	13,6	9,6	
13,5	28,8	19,7	
14,7	28,8	19,7	
11,0	14,7	17,1	400 mg %
11,7	14,3	16,2	
8,0	12,5	15,7	
8,4	11,9	14,9	
8,7	18,8	21,2	
10,1	16,7	21,9	
6,3	17,3	18,9	
8,2	15,4	21,4	
14,0	13,8	19,1	
14,4	13,0	18,5	
16,1	30,9	22,2	
13,5	37,9	20,4	

Tabelle 4 (Forts.)

Leerver- such	Versuch mit Glukose	Fruktose	Zucker- konz.
3,9	13,3	20,1	1000 mg %
3,6	13,3	21,5	
8,9	21,4	22,4	
11,6	21,4	21,9	
9,5	23,5	19,8	
10,3	21,8	17,3	
5,4	22,3	26,9	
6,2	16,1	26,2	

Die Tabelle 5 zeigt die statistische Auswertung der Ergebnisse aus Tabelle 4.

Tabelle 5

Mittlere CO_2 -Bildung der Ascites-Carcinom-
zellsuspensionen und ihre Schwankungen

	Leerversuche	Versuche m. Glukose 100-1000 mg %	Versuche m. Fruktose 100-1000 mg %
Mittlere CO_2 -Bildung in cm^3 / mg N und Stunde	9,4	18,5	19,1
Mittlere Ver- suchsstreuung in cm^3 / mg N und Stunde	$\pm 3,4$	$\pm 5,9$	$\pm 4,2$

Zu den Ergebnissen der CO_2 -Bestimmungen ist von vornherein zu bemerken, daß bei der angewandten Methode nur ein Teil des tatsächlich gebildeten CO_2 gemessen wird, während der andere Teil des entstandenen CO_2 in der Pufferlösung retiniert wird. Bei den hier wiedergegebenen Größen kann es sich daher nicht um Absolutwerte der CO_2 -Bildung handeln. Eine verglei-

chende Beurteilung der gemessenen Werte hinsichtlich einer Vermehrung oder Verminderung ist jedoch gerechtfertigt .

Aus Tabelle 5 ergibt sich eine relativ niedrige CO_2 -Bildung der Carcinomzellsuspensionen ohne Substrat ,nämlich 9,4 cmm / mg N und Stunde.

Der Zusatz von Hexosen erhöht sie signifikant und zwar bei Glukose auf 18,5 cmm / mg N und Stunde ,also um 96 % , bei Fruktose auf 19,1 cmm / mg N und Stunde , also um 103 % . Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Leerwert = 100 % .

Der Unterschied zwischen der Erhöhung der CO_2 -bildung durch Glukose einerseits , durch Fruktose andererseits,ist nicht signifikant .

Auch kann keine Abhängigkeit der Vermehrung der CO_2 -Bildung von der Konzentration der zugesetzten Zucker im untersuchten Bereiche von 100 - 1000 mg % nachgewiesen werden.

C. Der respiratorische Quotient der
Ascites-Carcinomzellsuspensionen

Aus 40 zusammengehörigen , d.h. an gleichen Zellsuspensionen durchgeführten Bestimmungen des O_2 -Verbrauches und der CO_2 -Bildung im Leerver- such und unter Glukose und Fruktose in verschiedenen Konzentrationen wurden die in Tabelle 6 wiedergegebenen respiratorischen Quotienten (RQ) berechnet .

Tabelle 6
Der RQ der Ascites-Carcinom-
zellsuspensionen

Leerver- such	Versuch mit Glukose Fruktose		Zucker- konz.
0,26	1,16	0,87	100 mg %
0,28	1,03	1,00	
0,35	1,02	1,01	
0,39	0,98	1,22	
0,26	0,89	0,96	
0,31	0,81	0,97	
0,32	1,11	0,85	
0,35	1,01	0,96	
0,33	1,05	1,03	
0,33	0,97	1,10	
0,50	1,18	0,81	200 mg %
0,52	1,22	0,85	
0,39	0,68	0,73	
0,41	0,70	0,79	
0,33	1,02	0,93	
0,35	0,98	1,02	
0,31	0,69	0,55	
0,33	0,82	0,56	
0,32	1,18	0,71	
0,33	1,36	0,69	
0,29	0,77	0,73	
0,33	0,69	0,72	
0,30	0,68	0,78	
0,30	0,61	0,70	

Tabelle 6 (Forts.)

Leerver- such	Versuch mit Glukose Fructose		Zucker- konz.
0,32	1,06	1,03	400 mg %
0,38	0,91	1,11	
0,28	0,96	0,91	
0,36	0,89	0,97	
0,37	0,52	0,72	
0,39	0,58	0,72	
0,62	1,52	0,95	
0,56	1,82	0,90	
0,19	0,79	1,10	1000 mg %
0,19	0,79	1,23	
0,34	1,21	1,13	
0,42	1,16	1,17	
0,36	1,21	0,98	
0,42	1,10	0,84	
0,21	1,16	1,17	
0,25	0,82	1,17	

Mittelwerte und Streuung des respiratorischen Quotienten sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7

Der mittlere RQ der Ascites-Carcinomzell-suspensionen und seine Schwankungen

	Leerversuche	Versuche m. Glukose 100-1000 mg %	Versuche m. Fructose 100-1000 mg %
Mittlerer RQ	0,35	0,98	0,92
Mittlere Streu- ung des RQ	$\pm 0,09$	$\pm 0,26$	$\pm 0,18$

Es ergibt sich also bei den Carcinomzellsuspensionen ohne Zuckerzusatz ein sehr niedriger RQ. Der niedrige Wert ist zum Teil auf die auf S.18 erwähnten Schwierigkeiten bei der CO_2 -Bestimmung zurückzuführen. Die Erhöhung des RQ bei Zuckerzusatz ist jedoch signifikant. Nicht signifikant ist dagegen der Unterschied zwischen dem RQ unter Glukose einerseits und Fruktose andererseits. Auch ist es nicht möglich eine Abhängigkeit der Höhe des RQ von der Konzentration des zugesetzten Zuckers nachzuweisen.

DISKUSSION

Die Diskussion der Versuchsergebnisse hat sich mit folgenden Tatsachen auseinanderzusetzen :

1. Die endogene Atmung gewaschener Mäuse-Ascitescarcinomzellen zeigt einen hohen Sauerstoffverbrauch und eine geringe CO_2 -Bildung.

2. Bei Zugabe von Hexosen wird eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches und eine Zunahme der Kohlendi-
oxydbildung beobachtet, die ihren Ausdruck in einer Erhöhung des RQ finden.

3. Glukose setzt den Sauerstoffverbrauch der Zellsuspensionen stärker herab als Fruktose.

Diese Ergebnisse führen zu folgenden Erwägungen :

Den Tumorzellen werden durch die Waschung energieliefernde Substrate entzogen, was auch KUN und TALALAY (3) für glykolsierbare Substanzen nachgewiesen haben. Die Zellen sind daher gezwungen ihren Energiebedarf aus sich heraus, endogen, zu decken und die in ihnen ablaufenden Stoffwechselvorgänge entsprechen weitgehend denen des Hungerstoffwechsels, wobei in erster Linie an einen gesteigerten Fett- oder Eiweißabbau zu denken ist. Diese Annahme wird durch den niedrigen RQ bestätigt.

Bei Zusatz von Hexosen, also von energieliefernden Substanzen, die für die Tumorzellen physiologisch sind (3) stellen sich die Zellen ganz auf den Abbau

dieser Substrate ein und die aeroben Hungerstoffwechselprozesse treten zugunsten des Kohlenhydratabbaus in den Hintergrund . Dabei wäre ein Ansteigen des RQ zu fordern , also eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches und eine Zunahme der Kohlendioxydbildung . Diese Forderung wird durch die Versuchsergebnisse erfüllt.

Es handelt sich dann bei der Herabsetzung der O_2 -aufnahme nicht um eine Hemmung von sauerstoffverbrauchenden Lebensvorgängen , woran etwa bei Zusatz von Zucker in höheren Konzentrationen im Hinblick auf eine osmotische Schädigung der Zellen zu denken wäre , sondern um die Umstellung der Stoffwechsellage der hungernden Zelle auf einen für sie physiologischen anaeroben Stoffwechsel.

Eine unterschiedliche Herabsetzung des Sauerstoffverbrauches der Carcinomzellen durch Glukose einerseits , durch Fruktose andererseits müßte demnach in einer verschiedenen Verwertbarkeit der beiden Zucker für die Zellen begründet sein , und zwar in dem Sinne, daß der Zucker für die Zelle besser verwertbar ist , der die Sauerstoffaufnahme stärker herabsetzt , im vorliegenden Falle also die Glukose .

Die unterschiedliche Verwertung von Glukose und Fruktose durch intakte Zellen., speziell Tumorzellen war bereits Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen.

So wies BOYLAND (6) an einigen Sarkomen nach , daß die Tumorzellen aus Glukose mehr Milchsäure bilden als aus Fruktose und KUN und TALALAY (3) konnten zeigen , daß unter anaeroben Bedingungen von Mäuse-Ascitescarcinomzellen Glukose besser abgebaut wird als Fruktose.

Der Faktor, der die unterschiedliche Verarbeitung der beiden Hexosen in der Zelle bewirkt , muß in der Reaktionsfolge des Kohlenhydratabbaus vor der

Bildung der Hexose-Diphosphorsäure zu suchen sein, da von dieser Zwischenstufe ab beide Zucker als identische Verbindungen ihren Abbauweg durchlaufen.

Es käme somit die Aufnahme des Zuckers in die Zelle sowie eine Reihe von Phosphorylierungsreaktionen vor der Bildung der Hexose-Diphosphorsäure als möglicher Angriffspunkt dieses Faktors in Betracht.

HINSBERG (7) war geneigt den Unterschied in der Glukose- und Fruktoseverwertung einer unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Zucker in die Zelle zuzuschreiben, da der Unterschied nur bei Untersuchung intakter Zellen besteht, nicht aber bei Untersuchung von Zellextrakten.

Nach Auswertung der Untersuchungen über die von MEYERHOF (8) aufgeklärte Schlüsselstellung der Hexokinasereaktion im Kohlenhydratabbau, ließe sich auch in dieser Reaktion ein Ort finden, wo der den Unterschied bewirkende Faktor angreift. So gibt BREUSCH (9) an, daß in Geweben mit niedriger ATPase-Aktivität, also mit hohem ATP - Gehalt eine stärkere Affinität der Hexokinase zur Glukose besteht. Nach den Ergebnissen von KUN und TALALAY (3) phosphoryliert auch die Hexokinase der Ascites-Carcinomzellen die Glukose schneller als die Fruktose. Darauf dürfte auch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte bessere Verwertung der Glukose beruhen.

Ob die stärkere Affinität der Ascites-Carcinomzellen - Hexokinase zur Glukose auf dem von BREUSCH berichteten Effekt einer niedrigen ATPase-Aktivität beruht, müssten Untersuchungen dieser Fermentaktivität in den Ascites-Carcinomzellen ergeben.

Nach den in dieser Richtung bisher vorliegenden - den, wenigen Untersuchungsergebnissen zu schließen, scheinen in der Tat Tumorzellen eine gegenüber normalen Zellen erniedrigte ATPase-Aktivität aufzuweisen.
(10).

Die vorgelegte Arbeit beschränkt sich somit darauf, gezeigt zu haben, daß Fruktose die dem Hungerstoffwechsel ähnliche, aerobe Stoffwechsel- lage gewaschener Mäuse-Ascitescarcinomzellen weniger gut aufheben kann als Glukose in den gleichen Konzentrationen, woraus man schließen darf, daß Fruktose für die untersuchten Tumorzellen weniger als Nährsubstrat geeignet ist als Glukose.

ZUSAMMENFASSUNG

An Hand von Untersuchungen in der Warburg-Apparatur wird gezeigt , daß gewaschene Mäuse - Ascitescarcinomzellen ohne Substratzusatz einen Hungerstoffwechsel mit geringer CO_2 -Bildung und hohem O_2 -Verbrauch aufweisen. Zugesezte Hexosen werden unter Ansteigen der CO_2 -Bildung und Minderung der O_2 -Aufnahme abgebaut ,wobei Glukose den Effekt der Sauerstoffverbrauchsminderung stärker zeigt als Fruktose. Aus letzterem wird geschlossen, daß Mäuse-Ascitescarcinomzellen die Glukose besser verwerten . Eine stärkere Affinität der Asciteszellen-Hexokinase zur Glukose wird an Hand von Ergebnissen anderer Untersucher als mögliche Ursache der Bevorzugung dieses Zuckers diskutiert.

LEBENS LAUF DES VERFASSERS

Der Verfasser der vorliegenden Arbeit ,
Boris K u b a l e k , wurde am 24.5.1930 als Sohn
des Justizbeamten Josef Kubalek und dessen Ehefrau
Hildegard , geb. Nechutnys in Böhmisches Leipa (CSR)
geboren. Er besuchte 4 Jahre die tschechische und
deutsche Volksschule in B.Leipa und trat 1940 in die
Oberschule für Jungen am gleichen Orte ein. Er absol-
vierte bis Kriegsende 5 Klassen der Anstalt, trat
dann in das tschechische Realgymnasium ein und
besuchte es bis zu seiner Ausweisung nach West -
deutschland im Jahre 1948 . Im Jahre 1949 legte er
an der Oberrealschule in Amberg die Reifeprüfung ab.
Er wohnte in Vilseck / Opf. und später in Neukir-
chen / Hl.Blut. Im Mai 1950 begann sein Medizinstu-
dium an der Friedrich-Alexander-Universität in Er-
langen ,wo er im Sommer 1952 die ärztliche Vorprü-
fung ablegte.

Der Verfasser beabsichtigt im Herbst 1955 in
Erlangen die ärztliche Prüfung abzulegen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht,
Herrn Stadtmedizinaldirektor Prof.Dr.J a h n ,
Direktor der I.Med.Klinik der städtischen Krankenanstalten Nürnberg, für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates zur vorliegenden Arbeit zu danken.

Herrn Dr.H i l l e r bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Unterstützung bei der Durchführung der erforderlichen Laborarbeiten.

